

DE 197 38 626

The invention relates to a micro through flow and cultivating cuvettes for continuous, microscopic and videomicroscopic viewing of anorganic and organic (dead and alive) particles as well as for cultivating of living micro organism in still and flowing watery media, consisting of glass as micro through flow and cultivating cuvette, characterized in that ground glass and covering glass are glued together using silicone rubber such that between the glasses there is provided a cavity having a thickness of approximately 10 μm and 500 μm (preferably approximately 250 μm) and to the ends there are silicone- (or other synthesis rubber-) frames glued, using silicone rubber such that into the dedicated boreholes charge and discharge tubes can be inserted and released therefrom in a liquid-tight manner.



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 38 626 A 1**

⑤ Int. Cl. 6:
G 01 N 21/05
G 01 N 21/09
G 01 N 21/11
G 01 N 21/15
G 01 N 15/00
G 01 N 33/483
G 01 N 33/50
G 01 N 33/532
G 01 N 33/569
C 12 M 1/34
C 12 Q 1/02
C 12 Q 1/06

⑦ Aktenzeichen: 197 38 626.1
⑧ Anmeldetag: 4. 9. 97
⑨ Offenlegungstag: 11. 3. 99

41

// G01N 33/18, 33/02, 33/15

- ⑦① Anmelder:
Wendlandt, Erhard, 88662 Überlingen, DE
- ⑦② Erfinder:
gleich Anmelder
- ⑤⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:
- | | |
|----|---------------|
| DE | 196 28 002 C1 |
| DE | 42 09 460 C2 |
| DE | 37 39 046 C2 |
| DE | 31 46 423 C2 |
| DE | 44 23 935 A1 |
| DE | 41 37 060 A1 |
| DE | 40 04 990 A1 |
| DE | 36 03 905 A1 |
| DE | 34 42 910 A1 |
| DE | 34 17 075 A1 |

DE	33 22 488 A1
DE	26 42 917 A1
DE-OS	21 16 588
DE-OS	15 98 621
DD	2 18 959 A1
GB	14 73 618
US	44 05 235
EP	06 38 799 A1
EP	04 88 947 A1

CHRISTENSEN, Douglas, et.al.: Analysis of
Excitation and Collection Geometries for Planar
Waveguide Immunosensors. In: Spie, Vol. 1886,
1993, S.2-8;
Prospekt: Produktübersicht, Fa. Hellma, 1994,
S.10;
Jp Patents Abstracts of Japan:
60-125540 A, P-404, Nov. 12, 1985, Vol. 9, No. 285;
07128223 A;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren mit Vorrichtungen zur Identifizierung und Charakterisierung von mikrobiologischen Individuen -
nebst ihrer Kultivierung - sowie Partikeln im Mikrometer-/Nanometerbereich mit Hilfe von Mikrodurchfluß- und
Kulturküvetten

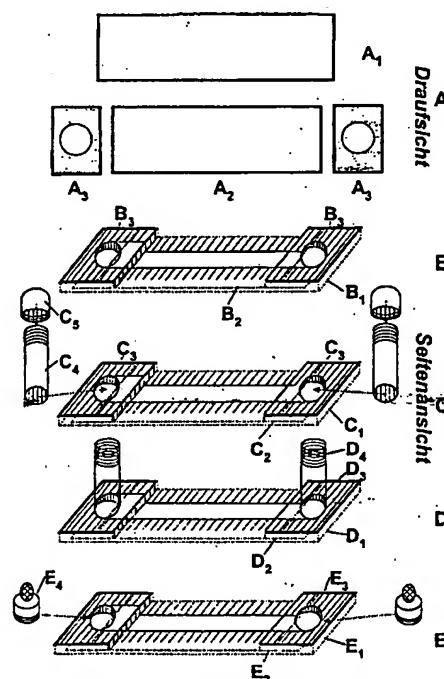
- ⑤⑦ Das Verfahren mit Vorrichtungen zur Identifizierung
und Charakterisierung von mikrobiologischen Individuen
- nebst ihrer Kultivierung - sowie von Partikeln im Mikro-
meter-/Nanometerbereich mit Hilfe von Mikrodurchfluß-
und Kulturküvetten erschließen neue Möglichkeiten ins-
besondere auf dem Sektor der mikrobiologischen Analy-
tik.

Als Anwendungsbereiche dieser neuen Technik können u.
a. die Analytik und Diagnostik im Trinkwasser-/Abwasser-
bereich sowie im klinischen, lebensmitteltechnischen,
biotechnologischen und pharmazeutischen Bereich ge-
nannt werden.

Die vorliegende Erfindung bietet ein sehr preisgünstiges,
schnelles qualitatives sowie quantitatives Verfahren an,
bei dem mit Minimalmengen an Untersuchungsmaterial
und Nährmedien gearbeitet werden kann und mit dem,
mit Hilfe der Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten, mikro-
skopische sowie videomikroskopische Betrachtungen,
Auswertungen und Dokumentationen von anorganischen
und organischen (toten und lebenden) Partikeln/Individu-
en sowie der Kultur von lebenden Mikroorganismen in
stehenden oder fließenden wäßrigen Medien durchge-
führt werden können.

In Bild 1A bis E ist schematisch der Aufbau der Mikro-
durchfluß- und Kulturküvetten nach der Erfindung darge-
stellt.

Wesentliches Merkmal der nach der Erfindung hergestell-
ten Mikrodurchfluß- und Kulturküvette ist der z. B. mit Sil-
conkautschuk verklebte Grundkörper, der eine Reinigung
mit effektiven und aggressiven Mitteln zuläßt. Außerdem
ist eine nach den herkömmlichen Verfahren ...



DE 197 38 626 A 1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren mit Vorrichtungen – vorzugsweise einsetzbar auf dem Sektor der mikrobiologischen Analytik im Trink-/Abwasserbereich sowie im klinischen, lebensmitteltechnischen, biotechnologischen und pharmazeutischen Bereich – der im Gattungsteil des Patentspruchs genannten Art.

Es sind eine Vielzahl von Verfahren mit speziellen Vorrichtungen bekannt, die sich mit der im Titel erwähnten Problematik befassen. Hierzu gehören u. a. Verfahren, die mit sehr aufwendigen Techniken – beispielsweise der Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie, Epifluoreszenz-Mikroskopie oder der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) u. a. – nur bedingt zum gewünschten Ziel führen. Diese Verfahren und Techniken sind (wegen der immensen Kosten) nur wenigen spezialisierten Instituten vorbehalten, wobei außerdem zu bemerken ist, daß zufriedenstellende Ergebnisse erst nach längeren Zeiträumen und aufwendigen Probenvorbereitungen erzielt werden.

Hier setzt die vorliegende Erfindung ein, der die Aufgabe zugrundeliegt, ein sehr preisgünstiges und enorm schnelles Verfahren zur Verfügung zu stellen. Die Neuerung bezieht sich im ersten Abschnitt auf Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten zur kontinuierlichen, mikroskopischen und videomikroskopischen Betrachtung von anorganischen und organischen (toten und lebenden) Partikeln sowie der Kultur von lebenden Mikroorganismen in stehenden und fließenden wäßrigen Medien.

Vor etlichen Jahren wurden vom Antragsteller Mikrodurchflußküvetten aus Metall/Acrylglas mit Glasfenstern (Bild 3 A) entwickelt und in der Umkehr- sowie in der Dunkelfeld-Mikroskopie eingesetzt. Diese Mikrodurchflußküvetten besitzen den Vorteil, daß sie in der Schichtdickenstärke – durch Verwendung verschieden starker Dichtungsfolien – variabel gestaltet werden können.

Es gibt seit neuerer Zeit auch Durchflußobjektträger für die Mikroskopie, die aber den Nachteil besitzen, daß sie sehr zerbrechlich und sehr schlecht zu reinigen sind, wenn längere Zeitspannen, z. B. für die Sedimentation von Partikeln, eingehalten werden müssen, wobei dann das Sedimentgut – insbesondere Mikroorganismen – so fest am Boden haftet, daß mit normalen (auch alkalischen) Reinigungsmitteln die Durchflußobjektträger nicht mehr vollständig zu reinigen sind und z. B. bei quantitativer Auswertung von Probengut nicht mehr eingesetzt werden können.

Die Reinigung kann nur mit stärkeren säurehaltigen (oder lösemittelhaltigen) Reinigungsmitteln und eventuell im Ultraschallbad erfolgen. Diese Reinigungsprozeduren halten aber die genannten Durchflußobjektträger nicht aus, da sich der verwendete Kleber auflöst, Undichtigkeiten auftreten oder das gesamte System zerstört wird und ein weiterer Gebrauch somit ausgeschlossen wird.

Ein weiterer Nachteil bei den Durchflußobjektträgern besteht darin, daß diese nur in einer einzigen Schichtdicke (begrenzt durch die als Abstandshalter zwischen Objektträger und Deckglas eingearbeiteten Glaskapillaren) zur Verfügung stehen und mit einem relativ dicken Deckglas versehen sind und dadurch ein Arbeiten mit Objektiven > 40x sehr erschweren (unscharfe Abbildungen).

Außerdem sind die im Handel erhältlichen Durchflußobjektträger mit ca. 50,- DM sehr teuer und kommen somit als Einmal-Gebrauchsartikel, z. B. für bakteriologische Serienuntersuchungen nicht in Frage.

Hier setzt nun weiterhin die Neuerung nach der Erfindung ein. Die Neuerung dient dem Zweck, diese Mängel zu beheben.

Durch den Einsatz säure-, alkali-, lösemittel- und reini-

gungsmittelresistenter Klebstoffe – z. B. auf Siliconbasis – ist es nun möglich, die nach der Erfindung hergestellten Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten z. B. mit säurehaltigen und aggressiven Reinigungsmitteln beliebig oft und effektiv zu reinigen. Außerdem sind die nach der Erfindung hergestellten Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten völlig resistent gegen Ultraschall in Kombination mit aggressiven Reinigungsmitteln. Weiterhin sind sie nach den herkömmlichen Methoden sterilisierbar (autoklavierbar) sowie geeignet für die Mikrowellensterilisation.

Dieses trifft insbesondere für Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten aus Quarzglas zu, die für Untersuchungen im Ultraviolettbereich eingesetzt werden, wenn z. B. mit fluoreszierenden Medien gearbeitet werden muß.

Nach der Erfindung sind die Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten in mehreren Varianten herstellbar und einzusetzen.

Durch die Erfassung der eigentlichen Mikrodurchfluß- und Kulturküvette in einen schützenden Rahmen (Glasbruchschutz) – z. B. vorzugsweise aus Acrylglas oder einen beliebigen anderen Kunststoff – ist praktisch ein Zerbrechen auszuschließen, da außerdem die Zulauf- und Ablaufstutzen so angebracht werden können, daß sie in elastischen Siliconböcken (mit entsprechenden Lochbohrungen) einsteckfähig sind und bei mechanischer Belastung einem Druck oder Stoß nachgeben. Beim Zerkratzen des Grundkörpers der eigentlichen Mikrodurchfluß- und Kulturküvette kann diese ausgetauscht werden, wobei eine Verschraubungsmöglichkeit weitere Vorteile bietet.

Weiterhin können die Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten mit regulierbaren Ein- und Auslaufsystemen versehen werden, um Kontaminationen von außen zu verhindern oder im Durchflußbetrieb die Fluxrate zu regulieren. Weiterhin ist es nach der Erfindung möglich, die Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten – nach Befüllung – gänzlich ohne Füllstutzen zu betreiben, zu lagern, zu sterilisieren oder zu reinigen, wobei außerdem die Möglichkeit gegeben ist, die Zu- und Ablauföffnungen mit kleinen Verschlussstopfen – bei Bedarf auch steril – zu verschließen.

Für Routine-Untersuchungen können auch preisgünstige Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten hergestellt werden, die als Einwegmaterial genutzt werden können.

Die Neuerung nach der Erfindung wird beispielhaft und schematisch dargestellt in

Bild 1A 1 Trägerglas der Mikro- und Kulturküvette in der Draufsicht

Bild 1A 2 Deckglas der Mikro- und Kulturküvette in der Draufsicht

Bild 1A 3 Füllstutzen-Böcke der Mikro- und Kulturküvette in der Draufsicht

Bild 1B Verklebte Mikro- und Kulturküvette, ohne Füllstutzen, in der Seitenansicht

Bild 1B 1 Trägerglas

Bild 1B 2 Deckglas

Bild 1B 3 Füllstutzen-Böcke

Bild 1C Verklebte Mikro- und Kulturküvette in der Seitenansicht

Bild 1C 4 Füllstutzen mit Gewinde

Bild 1C 5 Schraubverschlüsse für Füllstutzen

Bild 1D Komplette Mikro- und Kulturküvette, mit Füllstutzen, in der Seitenansicht

Bild 1E Komplette Mikro- und Kulturküvette, ohne Füllstutzen, in der Seitenansicht

Bild 1E 4 Verschlussstopfen für den Einsatz der Mikro- und Kulturküvette 1E ohne Füllstutzen.

Weiterhin wird die Neuerung nach der Erfindung beispielhaft und schematisch dargestellt in

Bild 2A Mikrodurchfluß- und Kulturküvette in der Seitenansicht, ohne Glasschutz

Bild 2B Mikrodurchfluß- und Kulturküvette; verklebter Grundkörper mit Träger- und Deckglas

Bild 2C Glasschutz

Bild 2D wie 2A; jedoch mit Glasschutz

Bild 2E wie 2D jedoch verschraubt und mit Gummihütchen versehen.

Wird in einen der Zu- oder Ablaufstutzen (1 oder 2) – wie in **Bild 2A** dargestellt – Flüssigkeit mit den z. B. enthaltenen Mikroorganismen hineingegeben, so verteilt sich diese, nach dem Prinzip kommunizierender Röhren, durch den Verbindungskanal (3) in beide Stutzen gleichhoch. Durch Schräghalten der Mikro- und Kulturküvette ist es möglich, einen Fließvorgang zu bewerkstelligen, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung von Partikeln oder Mikroorganismen zu erzielen.

Wie in **Bild 3** (B bis G) zu erkennen ist, bieten sich mehrere Möglichkeiten des Einsatzes der nach der Erfindung hergestellten Mikro- und Kulturküvetten für die Mikroskopie an.

Bild 3B zeigt den Grundkörper mit Träger- und Deckglas sowie die z. B. mit Siliconmasse verklebten Siliconböcke als Halterungen für die Ein- und Auslaufstutzen.

Bild 3C zeigt beispielhaft einen Füllstutzen, der mit einer Schraubkappe versehen werden kann, die beim Aufsetzen soweit geschlossen oder geöffnet werden kann, daß entweder die Flüssigkeitssäule zum Stehen kommt, oder so regulierbar einen (schnellen oder bis zu einem sehr langsamen) Fließvorgang aufrecht hält. Einzelheiten eines Fließvorganges mit Mikroflüssigkeitsmengen und Mikrofließgeschwindigkeiten lassen sich nur mit Hilfe der Video-Mikroskopie dokumentieren und beobachten. Hierin liegt auch ein Schwerpunkt der Neuerung nach der Erfindung, nach der qualitative und quantitative Analytik betrieben werden kann, wobei Minimalmengen an Flüssigkeiten, die sich im Mikroliterbereich bewegen können und in sehr vielen Anwendungsfällen ausreichend sind.

Weitere Vorteile bietet die Neuerung durch die Erfindung z. B. bei der bakteriologischen Untersuchung, bei der völlig ohne Nährlösungen schon nach wenigen Minuten, längstens nach ein paar Stunden, durch videomikroskopische Untersuchungen sogar Einzelbakterien erkennbar werden und so bestimmt werden können. Außerdem kann man – z. B. bei Bakterien mit Eigenbewegung – tote von lebenden unterscheiden. Durch die Verwendung von enzymkompetenten Farbstoffen ist die Differenzierung auch bei unbeweglichen Bakterien mit Hilfe der Mikro- und Kulturküvetten möglich.

Bild 3D und **E** zeigt Beispiele dafür, wie nach der Befüllung der nach der Erfindung konzipierten Mikro- und Kulturküvetten ohne Einfüll- und Auslaufstutzen und nach Verschluss diese für die mikroskopische Analyse eingesetzt werden können. In dieser Form mit flachen und sterilisierbaren Verschlussstopfen ist auch eine Bebrütung und Anzucht von Kulturen sowie eine direkte mikroskopische Auswertung möglich.

Bild 3 zeigt Mikro- und Kulturküvetten nach der Erfindung mit Füllstutzen, bei dem in Ausführung 3E ein Schnappdeckelverschluss und bei 3G ein Schraubdeckelverschluss beispielhaft dargestellt ist. Ebenso können als Verschlüsse Hähne als Verschlussorgane integriert werden. Letztere Verschlüsse sind insbesondere dann vorteilhaft, wenn im Durchflußverfahren gearbeitet werden soll.

Bild 4 und **5** dokumentieren die Leistungsfähigkeit dieses nach der Erfindung angewandten Verfahrens, z. B. zur Identifizierung und Charakterisierung von lebenden Mikroorganismen.

Bild 4A zeigt Kokken-Spezies nach einer lichtmikroskopischen Aufnahme im "Dunkelfeld".

Bild 4B zeigt pathogene Protozoen – Kryptosporidien –

nach einer lichtmikroskopischen Aufnahme im "Dunkelfeld", wobei deutlich am unteren Bildrand eine sporulierte Sporozyste zu erkennen ist. Das Präparat wurde ohne jegliche Behandlung (Original-Faeces-Probe von einem Kalb) in einer Mikrodurchfluß- und Kulturküvette; nach der Erfindung, videomikroskopiert.

Bild 5A zeigt neben Kryptosporidien Bazillen-Spezies und **Bild 5B** Sporen von Bakterien-Spezies im monochromatischen Licht.

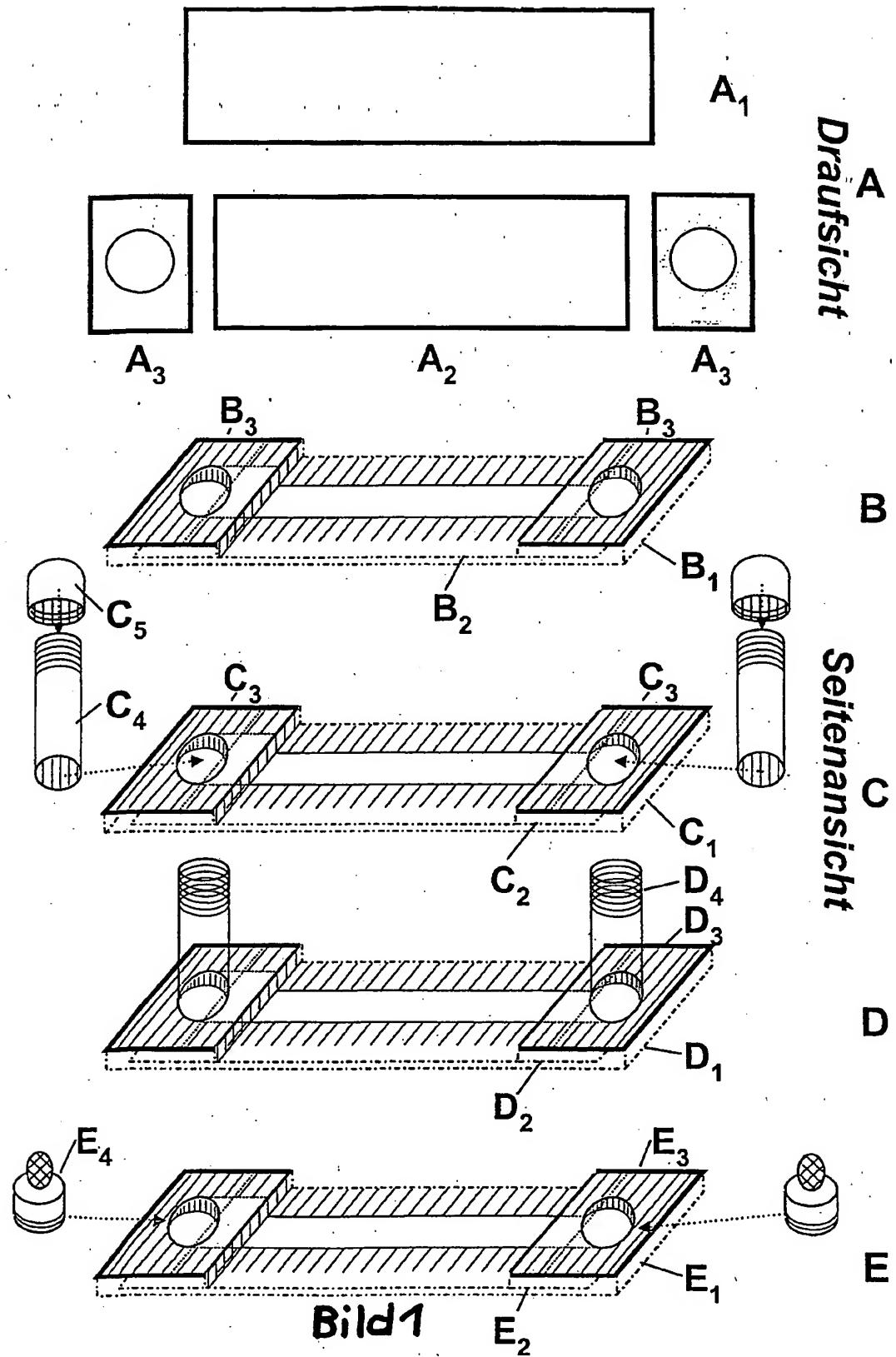
Patentansprüche

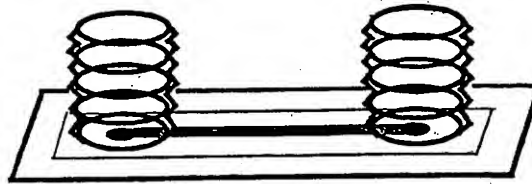
1. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten zur kontinuierlichen, mikroskopischen und videomikroskopischen Betrachtung von anorganischen und organischen (toten und lebenden) Partikeln sowie zur Kultur von lebenden Mikroorganismen in stehenden oder fließenden wäßrigen Medien; bestehend aus Glas als Mikrodurchfluß- und Kulturküvette, gekennzeichnet dadurch, daß Boden- und Deckglas mit Siliconkautschuk so verklebt sind, so daß zwischen beiden Gläsern ein Hohlraum in der Stärke von ca. 10 µm und 500 µm (vorzugsweise um 250 µm) entsteht und an den Enden Silicon-(oder andere Synthesekautschuk-)böcke mit Siliconkautschuk so aufgeklebt sind, daß in die vorgesehenen Bohrungen Zu- und Ablaufstutzen flüssigkeitsdicht eingesteckt und wieder entfernt werden können.
2. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Glaskörper aus Quarzglas besteht.
3. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verklebung der Küvettenkörper mit einem anderen beliebigen Klebstoff besteht, der völlig resistent ist gegen Ultraschall sowie in Kombination mit und ohne Ultraschall mit aggressiven Reinigungs- oder Desinfektionsmitteln.
4. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten dadurch gekennzeichnet, daß sie ganz oder zu einem Teil aus Kunststoff gefertigt und verklebt oder verschweißt sind.
5. Zu- und Ablaufstutzen für Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß diese aus Glas, Kunststoff oder Metall gefertigt sind und mit Schraubdeckel, Gummihütchen oder Schnappdeckel dicht verschlossen und mit regulierbaren Verschlussvorrichtungen (wie Kugel-/Schraubhähne mit und ohne Tüllen) versehen werden können sowie eine kontinuierliche Dosierung im Durchflußverfahren vorgenommen werden kann.
6. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß alle Teile sterilisierbar sind.
7. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß alle Teile nicht sterilisierbar sind.
8. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Glasschutz aus Metall oder vorzugsweise aus einem durchsichtigen Kunststoff – wie beispielsweise Acrylglas – über den Küvettenkörper durch Verschraubung oder Verklebung angebracht und fixiert wird.
9. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß nach Abnahme der Zu- und Ablaufstutzen – bei gefülltem oder leerem Zustand der Küvetten – diese mit Stopfen, vorzugsweise aus sterilisierbarem Material (wie Silicongummi), verschlossen werden können.

10. Zu- und Ablaufstutzen für die nach den Ansprüchen 1 bis 9 genannten Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten mit Zubehör, dadurch gekennzeichnet, daß diese z. B. mit Nährböden, Fluoreszenzmarker, Antikörpern, Enzymreaktionschemikalien, Farbstoffen, Indikatoren und anderen biochemischen Identifizierungs- und Detektionsstoffen soweit gefüllt sind, daß bei Probenzugabe und Vermischung der Komponenten der Inhalt, nach Aufsatz auf die Bohrungen der Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten, diese direkt befüllt werden können; die Böden der Zu- und Ablaufstutzen sind hierbei vorzugsweise aus Siliconkautschuk oder einem gleichwertigen sterilisierbaren Material gefertigt und herausnehmbar.
11. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Bodenplatten ein Zähl-Raster/-Gitter besitzen.
12. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Deckplatten ein Zähl-Raster/-Gitter besitzen.
13. Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Boden- und Deckplatten Zähl-Raster/-Gitter besitzen.
14. Mikroskopiereinrichtung für den Einsatz der in Anspruch 1 bis 8 genannten Mikrodurchfluß- und Kulturküvetten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Beleuchtungsrichtung für die Durchlichtmikroskopie so angebracht wird, daß eine extreme Schräglichtbeleuchtung erzielt und bei der mit monochromatischem Licht (Wellenlängenbereich von 220 bis 900 nm) im Dunkelfeld und/oder Phasenkontrast gearbeitet wird.
15. Mikroskopiereinrichtung für den Einsatz der in Anspruch 1 bis 8 und 11 bis 13 genannten Mikroskopier- und Kulturküvetten, dadurch gekennzeichnet, daß eine Beleuchtungsrichtung für die Durchlichtmikroskopie so angebracht wird, daß eine extreme Schräglichtbeleuchtung erzielt und bei der mit einem normalen Lichtspektrum/Sonnenspektrum im Dunkelfeld und/oder Phasenkontrast gearbeitet wird.
16. Beleuchtungsmittel für die in Anspruch 14 und 15 genannten Art, dadurch gekennzeichnet, daß diese als Halogen-, Krypton-, Wolfram-, Xenonlampen, Xenon-Blitzlichtlampen oder Aluminium-, Indium-, Gallium- sowie Phosphat-LEDs eingesetzt werden.

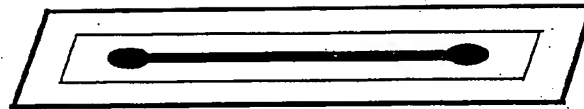
Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

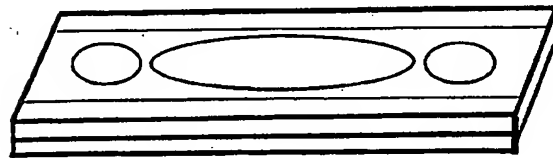




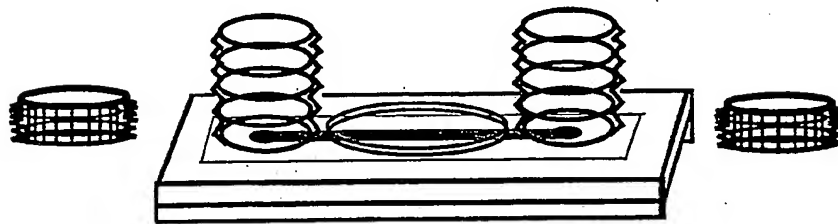
A



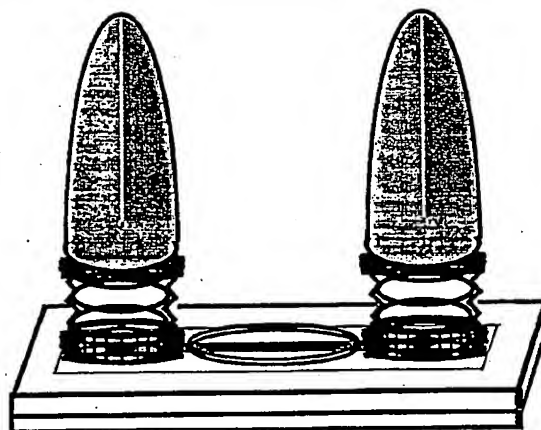
B



C



D



E

Bild 2

Best Available Copy

Nummer:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:

DE 197 38 626 A1
G 01 N 21/05
11. März 1999

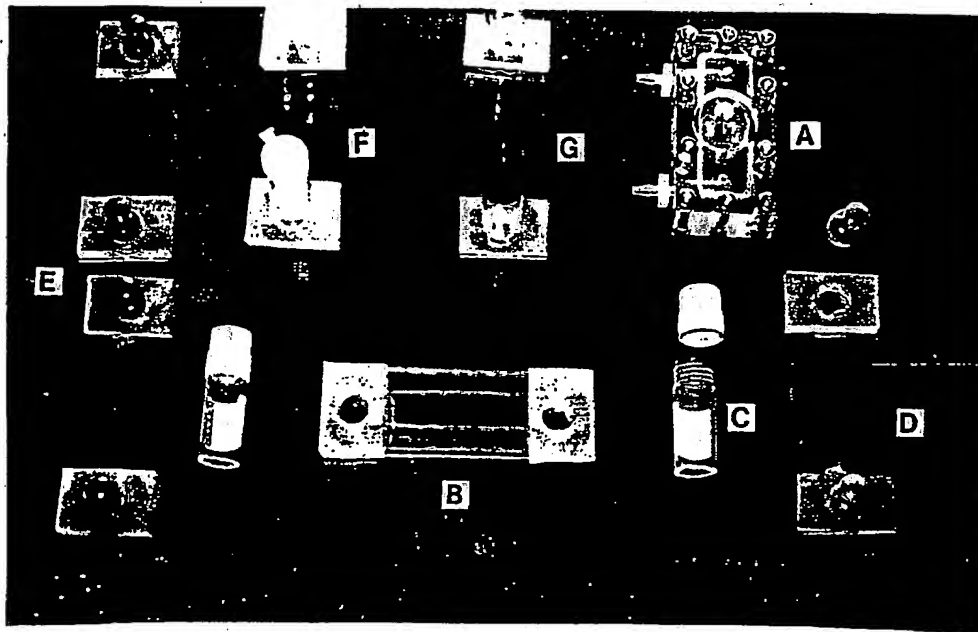


Bild 3

Best Available Copy

Nummer:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:

DE 197 38 626 A1
G 01 N 21/05
11. März 1999



Bild 4

Best Available Copy

Nummer:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:

DE 197 38 626 A1
G 01 N 21/05
11. März 1999

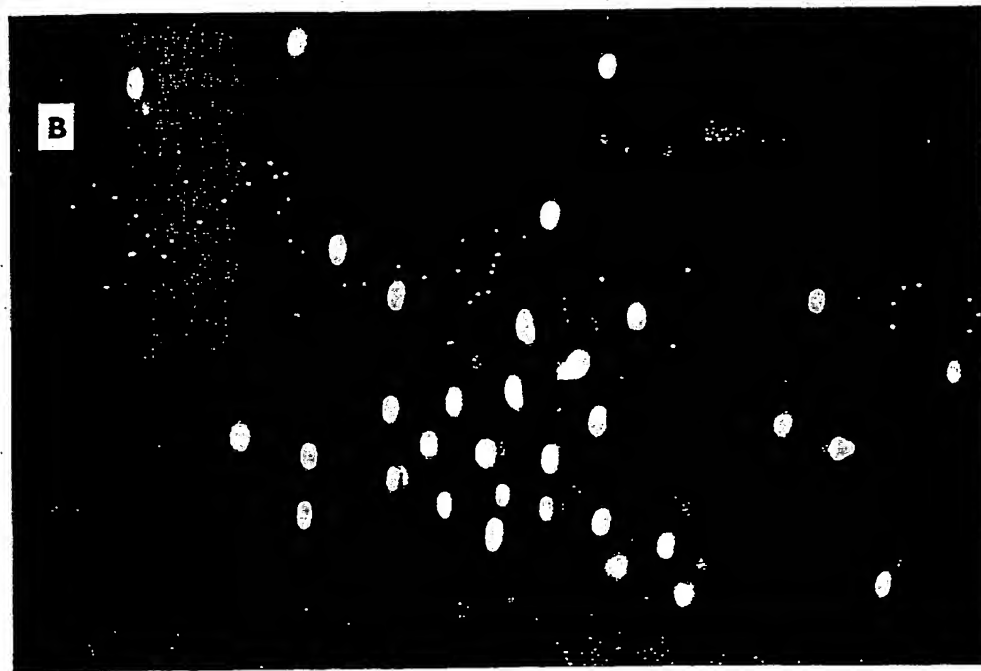


Bild 5